

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3633797 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 36 33 797.8
㉑ Anmeldetag: 3. 10. 86
㉒ Offenlegungstag: 7. 4. 88

㉓ Int. Cl. 4:
C07 K 15/06

C 07 K 7/40
C 07 K 7/34
C 07 K 7/32
C 07 K 7/30
C 07 K 3/02
// C07K 3/28

Behördeneigentlich

DE 3633797 A1

㉔ Anmelder:
Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.med., 6900
Heidelberg, DE

㉕ Erfinder:
gleich Anmelder

㉖ Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven Eiweissen (Peptiden) aus menschlichem und tierischem Blut (bzw. anderen Körperflüssigkeiten)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Eiweißen (Peptiden) aus menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten, insbesondere des Hämofiltrates/Hämodialysates aus menschlichem und tierischem Blut zum Zwecke einer Analyse und/oder ggf. zur medizinischen und/oder gewerblichen Verwendung. Aus dem Blut Nierenkranker werden seit Jahren durch Ultrafiltration die harnpflichtigen Substanzen abgeschieden, um Menschen mit Niereninsuffizienz am Leben zu halten. Zu dem Verfahren der Hämofiltration (bzw. Hämodialyse) werden Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 20 kD (kilo Dalton) in veno-venöser oder arterio-venöser Shuntverbindung an einem Dialysegerät aus der Blutflüssigkeit abfiltriert, während die größeren Moleküle und Blutkörperchen zurück in das Blut gelangen. Der Blutflüssigkeitsverlust mit lebenswichtigen Salzen wird durch Zusatz der gleichen Flüssigkeitsmenge ausgeglichen, während das »Hämofiltrat« (bzw. Hämodialysat) verworfen wird. Dieses Hämofiltrat/Hämodialysat enthält wichtige Eiweiße (Peptide), die als Wirkstoffe im Körper zirkulieren und die bei der Behandlung als Abfallprodukt verlorengehen. Es wurde gefunden, daß diese Abfallprodukte von größtem Wert für eine Analyse neuer, bisher unbekannter Wirkstoffe sowie für eine Analyse bekannter Wirkstoffe, die aber bei Erkrankungen in veränderter Konzentration und/oder in leicht bis stark veränderter Struktur sind. Ferner wurde gefunden, daß durch ein effizientes Aufbereitungsverfahren ...

DE 3633797 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Eiweissen zum Zwecke einer medizinischen, gentechnologischen und/oder gewerblichen Verwendung **dadurch gekennzeichnet**, dass die bei einer Hämofiltration und/oder Hämodialyse von menschlichem oder tierischem Blut anfallende Flüssigkeit zur Gewinnung von Eiweissen aufgearbeitet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass es zur Gewinnung von Eiweissmolekülen (Peptide), die im Körper als Wirkstoffe zirkulieren und als Peptidhormone und Neuropeptide die Körperfunktionen regulieren, verwandt werden kann.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe durch Anreicherung und Isolierung zur Analyse und Aufklärung ihrer Struktur gewonnen werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, dass die aus dem Hämofiltrat bzw. Hämodialysat gewonnenen Eiweisse nach ihrer Strukturaufklärung über die Synthese in grösseren Mengen künstlich hergestellt werden, indem sie durch Flüssigkeitsphasensynthese oder Festphasensynthese sowie über gentechnologische Verfahren in grösseren Mengen produziert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass durch Aufbereitung eines Hämofiltrates und/oder eines Hämodialysates aus menschlichem und tierischem Blut durch Zusatz von schwach ionischen Polysäuren (z.B. Alginsäure, Kieselsäure etc), z.B. Alginsäure im Verhältnis 1000/10 bis 0,1 (Liter/kg), vorzugsweise im Verhältnis von 1000/2,5 (Liter/kg), bei einem pH unter 7,2, vorzugsweise von pH 2,7, die Hormone des Herzens (z.B. Cardiodilatin-99-126 oder ANP etc.), die Hormone des Verdauungstraktes (z.B. Insulin, Glucagon, Secretin, Gastrin, Motilin etc.), die Hormone der endokrinen Organe (z.B. Hypophyse, Schilddrüse, Nebenschilddrüse etc.), die Neuropeptide des peripheren und zentralen Nervensystems zum Zwecke der medizinischen, gentechnologischen und/oder gewerblichen Verwendung unter Erhaltung der biologischen Aktivität gewonnen werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass die Eiweisse mit der gleichen Methode auch aus allen anderen Körperflüssigkeiten gewonnen werden (z.B. Urin, Ascites, Liquor etc.).

Beschreibung

In der heutigen Therapie von Nierenerkrankungen wird als Methode der Blutreinigung die Hämodialyse bzw. Hämofiltration benutzt, um harnpflichtige, schädliche Stoffe aus dem Blut zu entfernen. Dabei wird eine Flüssigkeit aus dem Blut abfiltriert, die alle Moleküle von einem niedrigerem Molekulargewicht als 20 kDalton enthält. Diese Flüssigkeit wird gelegentlich in wissenschaftlichen Arbeiten auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Es ist bekannt, dass die Filtratflüssigkeit Eiweissmoleküle enthält, die als Wirkstoffe im Körper zirkulieren. Routinegemäss werden jedoch diese Filtrate verworfen, wobei bei einem Behandlungstag pro Patient etwa 60 bis 100 Liter Hämofiltrat/Hämodialysat anfallen. Diese wertvolle Flüssigkeit wird an allen Behandlungsstationen verworfen. Damit gehen zahlreiche

biologische Wirkstoffe verloren, die als Eiweisse im Blut vorkommen. Sie sind in der Regel schwer herzustellen und werden nach einigen Verfahren aus den Bildungsorganen extrahiert, wie z.B. Insulin aus der Bauchspeicheldrüse. Da die Herstellung dieser Wirkstoffe durch chemische und biologische Synthese ebenfalls äusserst schwierig und kostspielig ist, und da für die Reindarstellung der genannten Eiweisse (Peptide) in ihrer wirksamen, im Blut zirkulierenden Form bislang keine Verfahren bekannt sind, sollte ein wirksames, gewerblich anwendbares Verfahren zur Gewinnung dieser Eiweisse in Mikro- bis Makromengen entwickelt werden.

Ziel der Erfindung

Es sollte ein einfaches Verfahren entwickelt werden, das erlaubt, die biologisch wirksamen Eiweisse aus dem Hämofiltrat (bzw. Hämodialysat) herzustellen. Dabei sollte die biologisch aktive Form und die Molekülstruktur nicht verändert werden. Erfindungsgemäss wurde festgestellt, dass man aus Hämofiltrat (bzw. Hämodialysat) durch Adsorption und nachfolgende Reinigung die Eiweisse für ihre Analyse, für die diagnostisch-therapeutische Anwendung und für gewerbliche Zwecke gewinnen kann. Besonderes Interesse gilt hier Wirkstoffen wie Herzhormonen, Hormonen des Verdauungsapparates, Hormonen der endokrinen Drüsen, Signalüberträgerstoffe des Gehirnes und peripheren Nervensystems.

Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten

1) Gewinnung eines Hämofiltrates/Hämodialysates, das von menschlichem Blut als Abfallprodukt bei Hämofiltration (bzw. Hämodialyse) Nierenkranker gewonnen wird oder bei Zuchttieren durch Anlegen eines Hämofiltrationsgerätes erhalten wird

2) Konzentrierung der Peptide des Hämofiltrates (bzw. Hämodialysates) durch Adsorption und Elution an Trägern, dass z.B. die Peptide in grösseren Mengen z.B. aus 10–1000000 Litern Hämofiltrat (Hämodialysat) in einem Eluat von ca. 0,05–10 Litern angereichert werden.

3) Die Peptidfraktion aus der gleichen Filtratmenge wird in lyophilisierter Form erhalten.

4) Aus der Filtratmenge werden die gewonnenen Peptide über konventionelle Chromatographieverfahren der Gelfiltration, Immunabsorption und Ionenaustausch weiter in Untergruppen nach Molekulargewicht, Immunoepitopen und physikochemischen Moleküleigenschaften wie Ionenstärke (insbesondere nach ihrer Acidität/Basizität) aufgeteilt.

5) Die Untergruppen der Peptide werden durch weitere Präzipitationsverfahren wie Ethanol-, Methanol- und Ätherfällung in weitere Untergruppen aufgetrennt.

6) Die Untergruppen der Peptide werden durch Gelchromatographie, Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) und High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) in einem oder zwei Reinigungsschritten hochgereinigt erhalten.

7) Die gewonnenen gereinigten Peptide werden in ihrer Wirksamkeit auf Targetzellen und über Rezeptorwirkung (auf Erfolgsorgane) auf ihre biologische Bedeutung hin analysiert.

8) Die gewonnenen, gereinigten Peptide werden durch Sequenzanalyse in ihrer Struktur aufgeklärt.

9) Die Struktur der gewonnenen, einheitlichen Peptide wird durch die Verfahren der Flüssigkeitsphasensynthese, Festphasensynthese und gentechnologischen

Synthese in grösseren Mengen nachgebaut. Sie sind für gewerbliche Zwecke verwendbar.

10) Die extrahierten Peptide werden direkt oder als Syntheseprodukte für die gewerbliche Anwendung benutzt.

11) Die extrahierten Peptide werden direkt oder als Syntheseprodukte, z.T. auch als Fragmente, zur Herstellung von heterologen und monoklonalen Antikörpern benutzt, die für die Immunteste wie Radioimmunoassay, ELISA, und weitere Verfahren der Immunodiagnostik verwandt werden.

12) Die Strukturen der extrahierten Peptide werden zur gentechnologischen Weiteranalyse prätranslational synthetisierter Peptide benutzt und diese wie oben bei 9. ff weiter verwandt.

13) Die Struktur der extrahierten Peptide wird dazu benutzt, neue, abgeleitete Strukturanaloga durch Modifikation der Aminosäuresequenz zu entwickeln, die, wie oben bei 9. ff geschildert, für gewerbliche Zwecke angewendet werden.

Beispiel der Anwendung des Verfahrens

Das Verfahren soll anhand der Erläuterung der Isolierung eines hormonell wirksamen Peptides, des Cardiodilatin-99-126 (auch als alpha-ANP — atriales natriuretisches Polypeptid bezeichnet), dargelegt werden. In einer, dem Erfahrenen vertrauten, ähnlichen Aufbereitungsweise können jedoch prinzipiell alle anderen, im Hämofiltrat (bzw. Hämodialysat) vorkommenden Ei-

Es werden Hämofiltrate (bzw. Hämodialysate) aus menschlichem oder tierischem Blut in Mengen von 10 bis 1000000 Litern aufgearbeitet.

Adsorption an Alginsäure

Die Eiweisse enthaltenden Ausscheidungsflüssigkeit wird angesäuert und mit Essigsäure und Mineralsäure auf pH 2,7 gebracht und pro 1000 l werden 2,5 kg Alginsäure oder alternativ mit Kieselgel (z.B. Aerosil, Firma Degussa) eingerührt. Nach 10 Std. haben sich die Peptide an die Alginsäure gebunden. Die Alginsäure wird abfiltriert mit Ethanol oder anderen Fettlösungsmitteln und 0,05 M Mineralsäure gewaschen. Nach Zugabe von 0,2 M Mineralsäure werden die Peptide in weniger als 5 Liter angereichert und durch Salzkuchenbildung bei pH 3,8–4,0 und Kochsalzsättigung erhalten. Durch Gelfiltration und anschliessender Lyophilisation oder durch Ultrafiltration und anschliessendem Lyophilisieren werden die gesamten Peptide in fester trockener Form gewonnen. Dieses Lyophilisat enthält alle bekannten und unbekannten Peptide mit bioaktiven Funktionen, z.B. Cardiodilatin-99-126 (weitere z.B. Insulin, Glucagon, Sekretin, Gastrin etc.), das durch Radioimmunoassay oder im Biotest nachgewiesen oder über ein chemisches oder biologisches Peptidscreening nachgewiesen werden.

Adsorption an Reverse Phase Material

Ebenso kann der Eiweisskuchen durch Adsorption und Elution an kommerziellen Reverse-Phase Materialien als Pulverform, in Lösung oder an Chromatographiesäulen, z.B. Nucleosil, Sepak C 18, etc., aus dem Hämofiltrat gewonnen werden.

Dialyse

Durch Dialyse mit kleinporigen Membranen und nachfolgender Lyophilisation kann ebenfalls eine Anreicherung erreicht werden.

Ultrafiltration

Weiter kann durch Ultrafiltration (Porenweite z.B. 500 Dalton) und anschliessender Lyophilisation eine Anreicherung der Eiweisse erhalten werden.

Aufteilung der Peptide durch Ionenaustauschchromatographie

Verschiedenen Verfahren der Ionenaustauschchromatographie ermöglichen eine Trennung in verschiedene Untergruppen der gewonnenen Eiweissmoleküle in grosstechnischem Mengen. Säulen mit einer Kapazität, die Peptide aus 1000–1000000 Liter Hämofiltrat/Hämodialyseflüssigkeit in einem Chromatographiegang abtrennen, können kontinuierlich benutzt werden.

FPLC/HPLC-Auftrennung

In der Regel sind nach der Ionenaustauschchromatographie zwei weitere Chromatographiegänge notwendig, um die Reinigung auf über 80% Reinheitsgrad zu erreichen, ein dritter Trenngang erreicht über 95%. Dazu sind Kombinationen von Reversephase-Verfahren der FPLC und HPLC mit verschiedenen Puffern möglich.

Sequenzanalyse der gereinigten Peptide

Hierzu sind die Sequenzierverfahren der Peptide mit Gasphase anzuwenden. In der Regel reichen die Peptide aus 1000 l Hämofiltrat aus, um eine Analyse mit kompletter Sequenz zu erhalten, da fast alle wichtigen Wirksubstanzen im fMol Bereich zirkulieren und im pMol Bereich durchsequenziert werden können.

Biologische Aktivität

Die Testung unbekannter Substanzen wird nach üblichen Verfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität, z.B. im Tierversuch, durch Organteste oder Gewebsteste, durchgeführt.

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USMC)